

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010121271 **Image available**
WPI Acc No: 1995-022522/199503
XRAM Acc No: C95-010406

**Method for conducting an array of chemical reactions - e.g. for
sequencing oligonucleotides or peptides**

Patent Assignee: PROTOGENE LAB INC (PROT-N); BRENNAN T M (BREN-I)

Inventor: BRENNAN T M

Number of Countries: 020 Number of Patents: 009

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
WO 9427719	A1	19941208	WO 94US5896	A	19940525	199503	B
US 5474796	A	19951212	US 91754614	A	19910904	199604	
			US 9368540	A	19930527		
EP 703825	A1	19960403	EP 94919240	A	19940525	199618	
			WO 94US5896	A	19940525		
JP 9500568	W	19970121	WO 94US5896	A	19940525	199713	
			JP 95500936	A	19940525		
EP 703825	B1	19970730	EP 94919240	A	19940525	199735	
			WO 94US5896	A	19940525		
DE 69404657	E	19970904	DE 604657	A	19940525	199741	
			EP 94919240	A	19940525		
			WO 94US5896	A	19940525		
US 5985551	A	19991116	US 91754614	A	19910904	200001	
			US 9368540	A	19930527		
			US 95465761	A	19950606		
CA 2163781	C	20001017	CA 2163781	A	19940525	200058	
			WO 94US5896	A	19940525		
US 6210894	B1	20010403	US 91754614	A	19910904	200120	
			US 9368540	A	19930527		
			US 95465761	A	19950606		
			US 99314456	A	19990518		

Priority Applications (No Type Date): US 9368540 A 19930527; US 91754614 A 19910904; US 95465761 A 19950606; US 99314456 A 19990518

Cited Patents: 01Jnl.Ref; EP 161058; WO 9003382; WO 9015070

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 9427719	A1	E	31	B01J-019/00	
				Designated States (National):	CA JP
				Designated States (Regional):	AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE
US 5474796	A		15	A01N-001/02	CIP of application US 91754614
EP 703825	A1	E		B01J-019/00	Based on patent WO 9427719
				Designated States (Regional):	AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
JP 9500568	W		32	B01J-019/00	Based on patent WO 9427719
EP 703825	B1	E	20	B01J-019/00	Based on patent WO 9427719
				Designated States (Regional):	AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
DE 69404657	E			B01J-019/00	Based on patent EP 703825 Based on patent WO 9427719
US 5985551	A			C12Q-001/68	CIP of application US 91754614 Cont of application US 9368540 Cont of patent US 5474796
CA 2163781	C	E		C07K-001/04	Based on patent WO 9427719
US 6210894	B1			C12Q-001/68	CIP of application US 91754614

Cont of application US 9368540
Cont of application US 95465761
Cont of patent US 5474796
Cont of patent US 5985551

Abstract (Basic): WO 9427719 A

A method for conducting chemical reactions between a soln. of a chemical reactant (CR) and an array of functional binding sites (FBS) on a support surface (SS) is claimed, comprising adding the soln. of CR to the functionalised binding site in amts. such that the soln. of CR at each binding site is sepd. from the soln. of CR at other binding sites by surface tension. Also claimed are: (1) Array plate comprising a SS with an array of distinct and sepd. FBS (which have a higher surface tension relative to the SS surrounding each binding site). (2) Making array plates comprising (a) coating a SS with a positive or negative photoresist substance which is subsequently exposed to light and developed to create a patterned region of a first exposed SS; (b) reacting the first SS with a fluoroalkylsilane to form a stable fluoroalkylsiloxane hydrophobic matrix on the first SS, (c) removing the remaining photoresist to expose a second SS, and (d) reacting the second support with a hydroxy- or aminoalkylsilane to form derivatised hydrophilic binding site regions. (3) Making array plates comprising (a) reacting a SS with a hydroxy- or aminoalkylsilane to form a derivatised hydrophilic SS, (b) reacting the SS with O-nitrobenzyl carbonyl chloride as a temporary photolabile blocking to give a photoblocked SS, (c) exposing the photoblocked SS to light, through a mask, to create unblocked areas on the SS with unblocked hydroxy- or aminoalkylsilane, (d) reacting the exposed surface with perfluoroalkanoyl halide or perfluoroalkylsulphonyl halide to form a stable hydrophobic (perfluoroacyl or perfluoroalkylsulphonamido) alkyl siloxane matrix, and (e) exposing the remaining photoblocked SS to create patterned regions of the unblocked hydroxy- or aminoalkylsilane to form the derivatised hydrophilic binding site regions.

USE - The method is esp. useful for determining or confirming the nucleotide sequence of target nucleic acids or for determin. of peptides or peptide mimetics that bind biologically active receptors.

ADVANTAGE - Uses relatively simple machinery to produce large, dense arrays of solid phase bound reactants in a reproducible and rapid manner.

Dwg.7/7

Abstract (Equivalent): EP 703825 B

A method for conducting chemical reactions between a solution of a chemical reactant and an array of functionalised binding sites on a support surface comprising adding the solution of chemical reactant to the functionalised binding sites in an amount where the solution of chemical reactant at each binding site is separated from the solution of chemical reactant at other binding sites by surface tension.

Dwg.0/7

Abstract (Equivalent): US 5474796 A

A method for making array plates comprises:

(a) coating a glass support surface with a positive or negative photoresist substance which is subsequently exposed to light and developed to create a patterned region of a first exposed surface and a photoresist coated surface on the support;

(b) reacting the first exposed surface with a fluoroalkylsilane to form a stable fluoroalkylsiloxane hydrophobic matrix on the first exposed surface;

(c) removing the photoresist coat on said photoresist coated surface so as to form a second exposed surface; and

(d) reacting the second exposed surface with a hydroxy- or

aminoalkylsilane so as to convert the second exposed surface to a derivatised hydrophilic binding site region and thus form the array plate.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-500568

(43) 公表日 平成9年(1997)1月21日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
B 0 1 J 19/00		9830-4D	B 0 1 J 19/00	Z
C 0 3 C 17/30		8928-4G	C 0 3 C 17/30	B
C 0 7 H 21/04		8815-4C	C 0 7 H 21/04	Z
C 0 7 K 1/04		8517-4H	C 0 7 K 1/04	
C 1 2 N 15/09	ZNA	9453-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-500936
 (38) (22) 出願日 平成6年(1994)5月25日
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)11月27日
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/05896
 (87) 国際公開番号 WO94/27719
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)12月8日
 (31) 優先権主張番号 08/068, 540
 (32) 優先日 1993年5月27日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP

(71) 出願人 プロトジーン・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94030, パロ・アルト, ファビアン・ウェイ
 (72) 発明者 ブレナン, トーマス・エム
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94030, サンフランシスコ, ブロードウェイ 2000, アパートメント 705
 (74) 代理人 弁理士 湯浅 英三 (外6名)

(54) 【発明の名称】 保持体表面上に化学反応のアレーを導入するための方法および装置

(57) 【要約】

本発明は、保持体表面上に機能化結合サイトのアレーを作るための装置および方法を提供する。さらに、本発明は、生理活性巨大分子をペプチドまたはペプチド模倣体に特異的に結合させることによって、オリゴヌクレオチドの配列を決定するための、および、生理活性巨大分子に結合するペプチドのアミノ酸配列を同定するための、装置ならびに方法を提供する。

(2)

特表平9-500568

【特許請求の範囲】

1. 化学反応物溶液および保持体表面上に機能化した結合サイトを持つアレー間で化学反応を行う方法であって、それぞれの結合サイトの化学反応物溶液が他の結合サイトの化学反応溶液から表面張力によって分離される量の化学反応物溶液を、機能化結合サイトに加えることからなる方法。
2. 機能化された結合サイトの保持体表面領域が、各々の機能化結合サイトを取り囲む保持体表面に比べてより大きい表面張力をもつ、請求項1記載の方法。
3. 保持体表面が一平方センチメートル当たり10-104の機能化結合サイトを持つ、請求項1記載の方法。
4. 機能化結合サイトが直径約50-2000ミクロンである、請求項1記載の方法。
5. 試薬溶液の体積が50 μ lから2 μ lである、請求項1記載の方法。
6. 化学反応物と機能化結合サイトとの間の化学反応が共有結合を形成する、請求項1記載の方法。
7. 化学反応物が共有結合ではなく特異的結合反応によって機能化結合サイトと反応する、請求項1記載の方法。
8. 異なる種類の分け隔てられた機能化結合サイトのアレーを持つ保持体表面からなり、その機能化結合サイトの領域がそれぞれの機能化結合サイトを取り巻く保持体表面に比べてより大きい表面張力をもつ、アレープレート。
9. 保持体表面が一平方センチメートル当たり10-104の機能化結合サイトを持つ、請求項8記載のアレープレート。
10. それぞれの機能化結合サイトが直径約50-2000ミクロンである、請求項8記載のアレープレート。
11. 機能化結合サイトが、試薬と共有化学結合を形成する試薬で機能化される、請求項8記載のアレープレート。
12. 機能化結合サイトが特異的結合対の一構成試薬である試薬で機能化される、請求項8記載のアレープレート。
13. (a) 光耐性または非耐性の物質で保持体表面をコーティングし、次

(3)

特表平9-500568

いで、光に晒して感光して、形模様化された第一の露光保持体表面領域を作り出し；

(b) 第一の保持体表面をフルオロアルキルシランと反応させて、第一の保持体表面上に安定なフルオロアルキルシロキサン疎水性マトリックスを形成し；

(c) 残された光耐性物質を取り除いて、第二の保持体表面を露出し；さらに、

(d) 第二の保持体をヒドロキシまたはアミノアルキルシランと反応させて、誘導体化された疎水性の結合サイト領域を形成する；

ことからなる、アレーブレードの作成方法。

14. フルオロアルキルシロキサンがテトラデカフルオロ-1、1、2、2-テトラヒドロオクチルシロキサンである、請求項13記載の方法。

15. (a) 保持体表面をヒドロキシまたはアミノアルキルシランと反応させて、誘導体化された疎水性の保持体表面を形成させ、；

(b) 保持体表面形成段階(a)を一時的な光不安定性ブロッキング剤としてのo-ニトロベンジルカルボニルクロリドと反応させて、光遮断された保持体表面を提供し；

(c) 段階(b)の光遮断保持体表面をマスクを通して露光して、保持体表面上にブロックされていないヒドロキシまたはアミノアルキルシランを持つ非ブロック領域を作り出し；

(d) 段階(c)の露出した表面をペルフルオロアルカノイルハロゲン化物またはペルフルオロアルキルスルホニルハロゲン化物と反応させて、安定な疎水性の(ペルフルオロアシルまたはペルフルオロアルキルスルホンアミド)アルキルシロキサンマトリックスを作り；さらに、

(e) 残された光遮断保持体表面を露光して、ブロックされていないヒドロキシまたはアミノアルキルシランの形模様領域を作り出し、誘導体化された疎水性の結合サイト領域を形成する；

ことからなる、アレーブレードの作成方法。

16. シロキサンが3-ペルフルオロオクタノイルオキシプロピルシロキサン

(4)

特表平9-500568

である、請求項15記載の方法。

17. シロキサンが3-ペルフルオロオクタンスルホンアミドプロピルシロキサンである、請求項15記載の方法。

(5)

特表平9-500668

【発明の詳細な説明】

保持体表面上に化学反応のアレーを導入するための方法および装置

発明の背景

発明の分野

本発明は、保持体表面で多数の化学反応を行う方法、保持体表面のマスキング方法、および保持体表面自身に関する。

関連技術の概要

オリゴヌクレオチドのアレーとのハイブリダイゼーションによってDNAを直接配列決定する計画は、この技術分野では既知である。Drmanacら、Genomics 4:114 (1989) は、標的DNAをドットプロット膜に結合させ、次いで、オリゴヌクレオチドアレーで厳密に調べることによる、ハイブリダイゼーションアレー仲介DNA配列決定法を提唱している。Khrapkoら、FEBS Letters 256, 118 (1989) は、保持体膜にオリゴヌクレオチドアレーを結合し、次いで、標的DNAで厳密に調べることによる、ハイブリダイゼーションアレー仲介DNA配列決定法を提唱している。

オリゴヌクレオチドまたはペプチドを結合させたアレーの合成法もまた、この技術分野で既知である。Houghtonは、Multiple Peptide System製造パンフレットの中で、ビーズのアレーがそれぞれに相互作用した後に物理的に分類されるT-バック法について記載している。この方法は、オリゴヌクレオチドの大きなアレーを調製するために巨大になる。Geysenら、J. Immunol. Methods 102:259 (1987) は、ペプチドアレーを調製するピン法について開示している。この方法によって生成されうるアレー密度には限界があり、この方法で用いる浸液方法は、實際上、煩わしい。サザン、ゲノムマッピングおよびシーケンシング会議 (Southern, Genome Mapping and Sequencing Conference)、1991年5月、Cold Spring Harbor, N. Y. は、ガラスプレート上の選択された区域が物理的にマスクされ、所望の

1
ルネ

4

(5)

特表平9-500568

反応はプレートのマスクされていない部分で行われるような、オリゴヌクレオチドアレー合成について開示している。この方法では、古いマスクを取り除き各々の反応後に新規のマスクを適用することが必要である。Fodorら、*Science* 251;767 (1991) は、合成中間体によるマスク直接の光化学的脱防護を用いた非常に密な50ミクロンのペプチド（およびオリゴヌクレオチドでも良い）アレーの合成方法について記載している。この方法は、光化学的脱防護の速度が遅いことによって、また、オリゴヌクレオチド合成の副反応（例えば、チミジン二量体の形成）に影響されやすいことによって、制限されている。Khrapkoら、*FEBS Letters* 256:118 (1989) は、マトリックス上のドットに4つのヌクレオチドのそれぞれをサンプリングすることのできるプリンター様装置を用い、二次元の保持体上で直接合成することによって、合成を簡素化することおよび万能オリゴヌクレオチドを固定することを示唆している。しかしながら、その様な装置をどのような方法で作るまたは使用するかについての詳細は、提供されなかった。

オリゴヌクレオチド合成に適した方法でガラスプレートにオリゴヌクレオチドを永久的に付着させるための幾つかの方法は、この技術分野で既知である。Sother, *Chem. abstr.* 113:152979r (1990) は、ガラス表面にオリゴヌクレオチドを永久的に付着させる安定なリン酸エステル結合について述べている。Mandeniusら、*Anal. Biochem.*, 157;283 (1986) は、ヒドロキシアルキル基がオリゴヌクレオチドの5'-水酸基に類似しており、固相合成を開始するための安定なアンカーを提供することを教授している。

関連技術には、固体保持体上の化学反応物のアレーに関連する数多くの考えおよび情報が含まれる。しかしながら、現存するまたは示唆された方法には限界があり、かなり高密度のアレーを都合よく且つ確かに生産することはない。それ故、反応サイトの密度がかなり高いアレーを調整するための新しい方法が必要である。理想的には、その様な方法は、比較的単純な機械装置を用いて、再現可能かつ迅速な方法で、固相結合反応物のかなり密集したアレーを作り出さなければならない。

(7)

特表平9-500568

発明の概要

本発明は、保持体表面上で多数の化学反応を行う方法を提供する。化学反応物溶液は、圧電ポンプを用いて、保持体表面上の機能化された結合サイトに、付加する。このポンプは、結合サイト上に化学反応物溶液の微小滴を置く。各々の結合サイトにある化学反応物は、表面張力によって他の反応物から隔てられている。典型的には、保持体表面は、一平方センチメートル当たり $10-10^4$ の機能化結合サイトを持ち、各々の機能化結合サイトは直径約 $50-2000$ ミクロンである。典型的には、各々の結合サイトに付加される試薬量は、体積で約 50 p l （ピコリットル）から $2\text{ }\mu\text{ l}$ （マイクロリットル）である。機能化結合サイトでの反応は、エステルまたはアミド結合のような共有結合を形成しても良く、抗体／抗原結合またはオリゴヌクレオチド特異的結合のような非共有特異的結合反応を含んでも良い。また、本発明は、アレープレートおよびアレープレートの作成方法を含む。

典型的には、アレープレートは、図2Aに示す手順：

- (a) 保持体表面を光耐性または非耐性の物質でコーティングし、次いで、光に晒して感光して、形模様化された第一の露光保持体表面領域を作り出し：
 - (b) 第一の保持体表面をフルオロアルキルシランと反応させて、第一保持体表面に安定なフルオロアルキルシロキサン疎水性マトリックスを形成させ：
 - (c) 残された光耐性物質を除去して、第二の保持体表面を露出させ：さらに、
 - (d) 第二の保持体表面をヒドロキシまたはアルキルシランと反応させて、誘導体化した疎水性結合サイト領域を形成すること：
- によって、作成される。本発明の望ましいシロキサン反応生成物は、テトラデカフルオロ-1, 1, 2, 2-テトラヒドロオクチルシロキサンである。図2Aで、細かい平行線は固体保持体であり、“S i”は第一の露光保持体表面のサイトを表し、“S i-F”は疎水性のフルオロアルキルシランのサイトであり、“S i-OH”は誘導体化した疎水性結合サイトである。

代わりに、アレープレートを、図2Bに示す手順：

- (a) 保持体表面をヒドロキシまたはアミノアルキルシランと反応させて、

(3)

特表平9-500568

誘導体化した疎水性の保持体表面を形成させ：

(b) 保持体表面形成段階(a)を、一時的な光不安定性ブロッキング剤としてのo-ニトロベンジルカルボニルクロリドと反応させて、光遮断された保持体表面を提供し；

(c) 段階(b)の光遮断保持体表面をマスクを通して光にさらし、保持体表面上に、ブロックされていないヒドロキシまたはアミノアルキルシランを持つ非ブロック領域を作成し；

(d) 段階(c)の露出表面をペルフルオロアルカノイルハライドまたはペルフルオロアルキルスルホンハライドと反応させて、安定な疎水性(ペルフルオロアシルまたはペルフルオロアルキルスルホンアミド)アルキルシロキサンマトリックスを形成させ；さらに

(e) 残された光遮断保持体表面を露光して、ブロックされていないヒドロキシまたはアミノアルキルシランの形模様領域を作り出し、誘導体化された疎水性結合サイト領域を形成すること；

によって、作成することもできる。本発明の望ましいシロキサンは、3-ペルフルオロオクタノイルオキシプロピルシロキサンおよび3-ペルフルオロオクタンスルホンアミドプロピルシロキサンである。図2Bで、細かい平行線は固体保持体であり、“-A”は親水性の保持体のサイトを表し、“-AB”は一時的に光不安定性をブロッキングした保持体のサイトを表し、“-AF”は疎水性サイトを表す。

また、本発明は、標的核酸のヌクレオチド配列を決定または確立するための方法を提供する。標的核酸は従来の方法で標識され、アレープレート上のサイトにあらかじめ結合させておいた既知配列のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。標識した標的核酸を結合したアレープレートは、次に、適当な厳密性で洗浄し、結合した標識化標的核酸の存在および位置をスキャニングアナライザー(scanning analyzer)を用いて決定する。アレー上の各々のエレメント内に共有結合で付着しているオリゴヌクレオチドの配列は既知であるので、これより、標的核酸のヌクレオチド配列をはっきりと決定することができる。

(9)

特表平9-500568

また、本発明の方法は、生理活性受容体を結合するペプチドまたはペプチド模倣体の定量に適用されても良い。この態様では、既知配列のペプチドアレーは、上記のように、同一の圧電ポンプ／表面張力仕切り法を用いて、ガラスプレートに適用することができる。次いで、得られたペプチドのアレーは、生理活性受容体リガンドと共に結合分析に用いて、受容体アゴニストおよびアンタゴニストのペプチド模倣体をスクリーニングすることができる。この様に、本発明は、ペプチドアレープレートの製造方法、表面張力区分によって分けられた共有結合ペプチドをもつペプチドアレープレート、および受容体アゴニストおよびアンタゴニストのペプチド模倣体をスクリーニングするためのその様なペプチドアレープレートの使用方法を提供する。

熟練者は、共有結合または特異的結合のいずれかを形成するための多様な結合サイトおよび化学反応物を認識しているであろう。

図面の簡単な説明

図1： 三量体のアレーを用いるハイブリダイゼーション分析。DNAフラグメントを結合した個々のドットを下線で示している。

図2A： 固相合成用に準備されるアレー表面の形成を図解している。

図2B： 0-ニトロカルバミン酸塩アレーのマスキング化学を図解している。

図3： ドット間隙界面での表面張力の壁効果。固相合成試薬を含む小滴は、表面張力の壁によって、ドットの周辺を越えては広がらない。

図4： 実施例1に従って調整したアレー表面での水素-ホスホン酸塩の固相オリゴヌクレオチド合成。

図5： 本発明のアレープレート合成方法で、個々のドットに固相合成試薬を配するために用いた圧電衝撃噴射の型の平面図および側面図。

図6： ブロックされたヌクレオチドおよび活性化試薬をアレープレート上の個々のドットに配する圧電衝撃噴射ヘッドの使用。示した形態は、固定ヘッド／移動プレートで組み立てられている。

図7： アレープレート、スライドカバー、並びに試薬の入口および出口の分岐管を示すアレー反応の包囲体

(10)

特表平9-500568

発明の詳細な説明

本発明を実施するに当たっては、多数の光耐性物質を用いることができる。これらの物質は当業者に既知である。例えば、光学的光耐性物質〔例えば、AZ 1350 (NovolacTM type-Hoechst CelaneseTM) (NovolacTMはnovolak所有の樹脂であり、酸縮合媒質中でのホルムアルデヒドとフェノールの反応生成物である)〕、または、E光線光耐性物質〔例えば、EB-9 (HoyaTMによるポリメタクリレート)〕を用いることができる。

多数のシロキサン機能化試薬、たとえば：

1. ヒドロキシアシルシロキサン

(シリル化物表面、ジボラン、およびアルコールを酸化するH₂O₂で機能化する)

- a. アリルトリクロクロロシラン → 3-ヒドロキシプロピル
- b. 7-オクト-1-エニル トリクロクロロシラン →
8-ヒドロキシオクチル

2. ジオール (ジヒドロキシアシル) シロキサン

(シリル化物表面、およびジオールに加水分解する)

- a. グリシジル トリメトキシシラン →
(2, 3-ジヒドロキシプロプロキシ) プロピル

3. アミノアルキルシロキサン (中間機能化段階を必要としないアミン)

- a. 3-アミノプロピル トリメトキシシラン → 3-アミノプロピル

4. 二量体化した第二アミノアルキルシロキサン

- a. ビス (3-トリメトキシシリルプロピル) アミン →
ビス (シリロキシルプロピル) アミン

さらに、本発明では、多数の代替機能化表面を用いることができる。これらには、以下のもの：

- 1. ヒドロキシアシル表面をガンマ照射またはクロム酸酸化および還元することによって機能化されたポリエチレン/ポリプロピレン；
- 2. バンジルアミン機能化表面をクロロメチル化しアミノ化することによって誘

(11)

特表平9-500568

導体化された高架橋のポリスチレン-ジビニルベンゼン:

3. ナイロン-末端アミノヘキシル基はそのまま反応性をもつ:

4. エッチングし還元したポリテトラフルオロエチレン:

が、含まれる。

パターン化されたオリゴヌクレオチドの合成において、マスク表面は、二つの重要な特徴を持つ。第一に、マスク表面は、通常のオリゴヌクレオチド合成条件では不活性でなくてはならず: 固体表面には、大部分の溶媒界面に、遊離した水酸基、アミノ基またはカルボキシル基が存在してはならない。第二に、表面は、より極性の機能化結合サイトとの関係で、アセトニトリルおよびグリコールエーテルのような一般的な有機溶媒によって僅かに湿っていないてはならない。

濡れ現象は、固体-液体界面での分子間の表面張力または引力で測定され、 dyne/cm^2 で表される。過フッ化炭化水素は、炭素-フッ素結合の独特の極性(電気陰性度)のために、表面張力が非常に低い。密に構築されたラングミュア-プロジェクト型の膜では、層の表面張力は、主に、アルキル鎖末端にあるフッ素の%によって決定される。密に配列されたフィルムでは、単一の末端トリフルオロメチル基が表面をペルフルオロアルキル層と同程度に疎油性に近くする。過フッ化炭化水素が、下にある誘導体化された固体(高架橋重合体)保持体に共有結合で付着している場合、反応サイト密度は、一般的には、ラングミュア-プロジェクトおよび基の密度より低くなるであろう。しかしながら、ペルフルオロアルキルマスキング剤を用いると、保持体表面の溶媒の接近しやすい領域では、比較的高いフッ素含有量が保たれる。

また、パターン化されたオリゴヌクレオチド合成において、誘導体化された領域には二つの重要な特徴がある。表面は、ハイブリダイゼーションの検出方法と矛盾してはならない。放射能は、DNAの研究では、殆ど、分光学、化学発光および蛍光による検出技術に取って換わっている。表面は、光学的に透明であることが望ましい。第二の重要な特徴は、表面に対して終りから二番目のオリゴヌクレオチドの結合が、少なくともDNAのポリホスフェート骨格のそれと同等の、高い化学安定性を持っていることである。

ガラス(ポリテトラシロキサン)の光学的性質は、検出目的には非常に優れて

(12)

特表平9-500568

いる。さらに、露出したガラス表面のマスクパターンを形成するために光耐性の厚いフィルム（1-5ミクロン）を用いる半導体工業によって、数多くの技術が発達した。第一の露光ガラス表面を誘導体化する最良の方法は、揮発性のフルオロアルキルシランを用いて気相拡散を行い、密に詰まった疎油性の単層を作り出すことである。重合した光耐性層は、露光領域を誘導体化する間、気体のフルオロアルキルシランに対して効果的な不透過性バリアーを提供する。しかしながら、疎油性誘導体化を行った後、残された光耐性層は、暖かい有機溶媒（メチル、イソブチル、ケトン、またはN-メチルピロリドン）に溶解することによって、第一の適用シラン層を完全に残したまま、容易に除去でき、第二の未加工のガラス表面を晒す。次いで、この第二領域のガラスは、固相でのオリゴヌクレオチド合成を固定するのに適した水酸基またはアミノ基のどちらかを含む第二の極性シランを用いて、溶液法または気相法のいずれかによって誘導体化することができる。

シロキサンは、強アルカリ性条件下では安定性が多少制限される。0.1N-水酸化ナトリウムといったような、ナイロンハイブリダイゼーションメンブレンからプローブを取り除くために典型的に用いられる条件は、再使用可能なガラス基板のハイブリダイゼーションアレーでは避けなければならない。

テフロン（ポリテトラフルオロエチレン）それ自体は、理想的な疎油性表面を提供するであろう。物質のこのタイプのパターン化された誘導体化は、物理的マスクを通した反応性イオンあるいはプラズマによる加工、または電子線の使用、次いで表面のヒドロキシメチル基の還元によって、完成させることができる。しかしながら、可視波長でテフロンは不透明であるため、ハイブリダイゼーションの検出に適應できる方法は、厳しく制限される。

最終適用次第では、他の有機ポリマーが、パターン化されたオリゴヌクレオチド合成に望ましい特徴を持っている。ポリプロピレンは可視光線で比較的透明である。その表面は、クロム酸酸化によって誘導体化され、化学安定性の高いオリゴヌクレオチド合成アンカーを提供するヒドロキシルまたはアミノメチル化された表面に転化されうる。高架橋のポリスチレン-ジビニルベンゼン（約50%）は非膨脹性であり、クロロメチル化し次いで官能基操作することによって容易

(13)

特表平9-500568

に

表面を誘導体化することができる。ナイロンは最初からヘキシルアミノ基表面を提供する。

これらの表面の疎油性パターン化は、厚いフィルムのマスキング技術の基本となる同タイプの溶液、およびガラスでは気相での誘導体化を用いて、またはオーニトロベンジルカルボニルブロッキング基を用いた直接的な光化学によるパターン化によって、成し遂げられうる。現在では、シランよりむしろペルフルオロアルキルカルボキシル酸およびスルホン酸誘導体が、オリゴヌクレオチド合成の間、下にある表面に疎油性のマスクを提供するために用いられる。

化学反応物溶液は、それぞれの結合サイトの化学反応物溶液が他の結合サイトの化学反応物溶液と表面張力によって分離される量を、圧電ポンプ（図5）を用いて、機能化された結合サイトに加えることができる。以下により詳しく記載するように、図5に示すポンプでは、反応物溶液は、入口（2）を通して、圧電ポンプの上方（1）プレートと下方（5）プレートの間に形成される部屋（6）に挿入される。上方プレートと下方プレートとの間に電圧の差を適用することによって圧電ポンプが圧縮され、ノズル（3）を通して微小滴（4）が引き出される。

。

図3は、機能化した結合サイト上への反応物溶液の寄託、およびこれに引き続いて起こる表面での反応について示している。溶液の微小滴（図3A）は、機能化結合サイト（図3Bの中央の斜交平行線文様の領域）に置かれる。機能化結合サイトおよびその周辺表面上での反応溶液の濡れ特性が異なるため、反応物溶液の微小滴は機能化結合サイト上でビーズ状になり、溶液中の反応物は表面と反応する（図3C）。

本発明で用いられるであろう圧電ポンプは、非常に正確に、表面上に液体の微小な小滴を配する。ポンプのデザインは、インクジェット記録に用いられるポンプと同じである。ピコポンプは、最大でも300Hzで、50ミクロンまたは65ピコリットルの小滴を作る能力を持ち、且つ、解放された通気環境で、2cmの距離から900℃のオープン内にある250ミクロンの標的に正確に命中させ

(14)

特表平9-500568

ることができる。本発明の装置の望ましい実施態様は、実施例3に示す。

代替のポンプのデザインは、確かな性能を得るために、以下の物理的要件およ

び機械的要件を考慮にいれなければならない。ポンプ内部の非圧縮性流体が高速高圧パルスに委ねられた場合、ポンプからの液体の流出方向は、置き換えられた液体の慣性抵抗によって最初に決まる。ノズル口を通る際よりも、入口側ではより多くの液体があるため、流れに対する抵抗がある。ノズルから押し出された液体の柱は、表面張力の結果として、分裂し始める。圧電ポンプのような流れの切断は、ノズルの中に引き戻された残留の液体の柱によって減力される。分裂された小滴は、当初の加速度で到達した速度で、飛び続ける。典型的には、放出速度は、約1-2 m/秒である。

150ミクロンの粘着性の水性インクの小滴を用いた典型的な印刷では、ヘッド速度は、典型的には約0.5 m/秒である。この運動は、横速度成分を小滴トラジェクトリーに加え、的あての正確さに好影響を及ぼしうる。また、滴を表面に命中させる場合に、滴が跳ねる原因となるかもしれない。固定ヘッドから発射された小滴は、前の滴の蒸気の通った後を追って追むために、よりゆっくりと蒸発する傾向にある。入口の補給ラインが柔軟性を必要せず、液体が加速度の力を受けない場合、ヘッドは最も確実に働く。

滴のサイズは、溶液の表面張力によって、およびポンプノズルの直径によって、主に決定される。小滴をより小さくすると、それはより早く蒸発し、そのトラジェクトリーは通風によってさらに好影響を受けるであろう。25ミクロンより小さいノズルはダスト粒子で塞がれる傾向にある。水では、滴の直径はノズルの直径のおおよそ1.5倍である。典型的には、滴は、大きさが5%以上は変化しないであろう。噴流もまた、 CH_3CN および MeOH を含む多数の極性溶媒を首尾良く噴出するであろう。これらのほとんど粘着性のない溶媒を用いると、強すぎる噴出パルスでは、最初の滴に加えて、引きずられた一連のサテライト小滴を形成する結果になるかもしれない。また、パルスの持続期間は、サテライト化に影響を及ぼす。

口がその本来の状態に戻った後、バルシングの次のサイクルが始められる前に

(15)

特表平9-500568

、ノズルが毛管作用で再び満たされる期間が与えられなければならない。ノズルが穴の上部に再び満たされるだけでなく、液体メニスカスが噴射の前面に広がらないことが重要である。これは、面をシラン化してその表面張力を減ずることによ

って防がれる。また、ヘッドは僅かに引圧下で操作して溢れ出すことを防いでいる。滴の標的は、ノズルの軸方向にあるが、面コーティングの欠陥は、トラジェクトリーに影響を及ぼしうる。

最大で64の独立した排気チャンバーを持つが共通の入り口を持つノズルのアレーが作られた。それぞれのチャンバーの入り口はある程度限定されているので、一つの排気チャンバーの操作が他に影響を与えることはない。ノズル間の分離は、印刷適用のために、典型的には400ミクロンであるが、緻密なアレーは、標的の横運動を入れ込む事、またはノズルの隙間を減ずることのいずれかによって作り出すことができる。

実施例1

オリゴヌクレオチドまたはペプチドを組み立てるアレープレートの調整

ハイブリダイゼーションアレーはガラスプレート上で合成される。プレートは最初に、安定なフルオロシロキサン 3-(1,1-ジヒドロベルフルオロオクチルオキシ)プロピルトリエトキシシランでコーティングされる。CO₂レーザーを用いてフルオロシロキサン領域を除去し、下にあるシリコンジオキシドガラスを露出させる。次いで、プレートは、ガラスの露出領域上のみに反応してグリシジルエポキシドを形成するグリシジルオキシプロピルトリメトキシシランでコーティングする。次に、プレートは、ヘキサエチレングリコールおよび硫酸で処理して、グリチジルエポキシドをリンカーアームとして作用するヒドロキシアルキル基に変換する。ヒドロキシアルキル基は、ヌクレオチドの5'-水酸化物に似ており、固相合成を開始させるための安定なアンカーを提供する。ヒドロキシアルキルのリンカーアームは、オリゴヌクレオチドとガラス表面との間に平均で3-4 nmの距離を提供する。ガラスへのシロキサン結合は、オリゴヌクレオチドまたはペプチド合成で典型的に用いられるすべての酸性および塩基性の脱プロテクト条件に完全に安定である。アレープレートを調整するこのスキームは

(16)

特表平9-500568

、図2Aおよび2Bに示すと共に、前述部分で考察した。

実施例2

アレープレート上でのオリゴヌクレオチドの組み立て

ドット内のヒドロキシアシルシロキサン表面は、おおよそ $\gamma = 47$ の表面張力を持つが、これに対してフルオロキシランでの表面張力は $\gamma = 18$ である。オリゴヌクレオチドの組み立てのために、選択された溶媒は、表面張力 $\gamma = 29$ のアセトニトリル、およびジエチルグリコールジメチルエーテルである。この様に、ヒドロキシアシルシロキサン表面はアセトニトリルによって完全に湿潤状態になるが、これに対してドットの間のフルオロシロキサンでマスクした表面はアセトニトリルによってほとんど湿潤状態にならない。アセトニトリル中のオリゴヌクレオチド合成試薬の小滴は、図3に示すように、ドット表面に適用され、ビーズ状になる傾向がある。隣接するドット間での混合は、マスクの非常に疎水性のバリアーによって防がれる。マスクドット界面でのアセトニトリルの接触角はおおよそ $\theta = 43^\circ$ である。プレートは整列したマイクロリットルの皿として効果的に働き、その中では個々の穴は重力よりもむしろ表面張力によって規定される。40ミクロンの小滴の容量は33 p lである。50ミクロンのドットに保持される最大容量はおおよそ100 p l、または約3小滴である。100ミクロンのドットはおおよそ400 p l、または約12小滴を保持する。最大に負荷すると、50ミクロンおよび100ミクロンのドットは、それぞれ約0.07および0.27 fM (フェムトモル) のオリゴヌクレオチドと結合する。

調製されたドット (図2B、底部) 上でのオリゴヌクレオチドの組み立ては、H-ホスホン酸塩法 (図4) に従って、またはホスホロアミダイト法によって行われる。両方法は、熟練者に熟知されている。「オリゴヌクレオチドおよびアナログ」(Oligonucleotide and analogs)、A Practical Approach (F. Eckstein編、1991)。アセトニトリル中の適切にブロックされたヌクレオチドおよび活性化試薬の個々のドットへの配置は、実施例3に記載するピコポンプ装置を用いて直接的に行われる。他のすべての段階 (例えば、DMT脱ブロック、洗浄) は、適切な試

(17)

特表平9-500568

薬で表面をフラジリングすることによってパッチ法でアレー上で行われる。8ノズルの圧電ポンプヘッドが、ブロックしたヌクレオチドおよび活性化試薬を個々の

のドットに配するために用いられ、1000 Hzでの小滴の配置は、512 x 512 (262 k) のアレーに置くために32秒を必要とするのみである。カップリング段階のいずれもが、臨界時間を必要としないため、最初と最後の小滴適用の間の反応時間の差は、重要ではない。

実施例3

圧電衝撃噴射ポンプ装置の構造

圧電衝撃噴射は、Photoceram (Corning Glass, Corning, N. Y.)、UV感受性セラミック、から標準的な写真製版技術を用いて作られ、ポンプの細部を作る。セラミックは焼成され、ガラス状態に変えられる。得られた空白部分は、次に、未露出領域よりも露出領域により早く作用するフッ化水素でエッチングされる。空間およびノズルの細部が一つのプレート内で適切な厚さで覆われた後に、完全なチャンバーは、第一プレートに第二（最上部）プレートを拡散結合させることによって形作られる。ノズル面が平らに覆われ、表面が処理され、次に、圧電エレメントはポンプチャンバーの外側でエポキシ化される。圧電エレメントがエネルギーを与えられた場合、それは、図5に示すように、片側がふいごの様に空間を變形させる。

アセトニトリル小滴を正確に発射するための適当な口サイズを決定するために、口サイズを連続して減少させた噴射ヘッドを調整し、試験した。40ミクロンのノズルが約65 p lの小滴を作り出した。

分かれたノズルアレーヘッドは4種のヌクレオチドのそれぞれに供給され、5番目のヘッドはカップリング用活性化試薬を配するために提供される。5つのヘッドは機械的に規定された間隔で互いに積み重なっている。それぞれのヘッドは400ミクロン離れて、8つのノズルのアレーを持つ。

完成したポンプユニットは、図6に示すように、ヘッドが固定され、移動するアレープレートの下方に小滴が発射されるように組み立てられる。完成したポンプユニット装置(3)は、各々の4種のヌクレオチドダーゼのためのノズルアレー

(18)

特表平9-500568

ヘッド(4-7)および活性化試薬のための5番目のヘッド(8)からなる。エネルギーが与えられた場合、微小滴(9)がポンプノズルから噴射され、アレー

プレート(1)上の機能化された結合サイト(2)に寄託される。

標的アレーを保持するプレートは、機械的ステージに保たれ、同時ドライバーによってヘッドの真下のXおよびY面に印をつけられる。機械的ステージは、小さなフライス削り機、顕微鏡、およびマイクロームで用いられるそれと同様であり、2.5ミクロンまたは0.1mmより正確に、同じ位置に再現される。図7に示すように、プレートホルダー(3)は、カバープレート(5)をアレー上方にスライドさせて囲われたチャンバーを形作ることを可能にする溝スペーサー(4)を備えている。回りにある入口(1)および出口(2)部分は、洗浄、共通のアレー反应用試薬の適用、または次のドットアレー適用サイクルのためのプレートの送風乾燥のために、プレートに多量の水を注いでも問題ないように、提供されている。

ステージおよびヘッドの両方の装置は、空にする、あるいはアルゴンで浄化して、無水状態を維持することの出来るグローブボックスの中に納められる。邪魔にならないところにスライドするプレートホルダーと共に、ヘッドへの入口のラインは、ヘッドチャンバーを準備することまたは洗浄溶媒をフラッシュすることによって完全に置換されるように気圧を一定に保つことができる。

6分の化学循環時間で、装置は1時間当たり1プレート、または106オリゴヌクレオチドの速度で、10量体のアレープレートを生産する。

実施例4

標的核酸のヌクレオチド配列を決定するための

オリゴヌクレオチドアレープレートの使用

オリゴヌクレオチドアレープレートは、実施例3記載の装置を用いて、実施例1および2記載の方法で調整される。アレーはそれぞれ10ヌクレオチド(10量体)のオリゴヌクレオチドを含む。合成は、それぞれのオリゴヌクレオチドエレメントが、5'-3'方向に動き、ヌクレオチド配列の予想されるエレメントと同一になるように行われるが、5'-の大部分のヌクレオチドが欠損し、新規に

(19)

特表平9-500568

3'-の大部分にオリゴヌクレオチドが付け加わる。この方法では、アレー全体で、十量体のオリゴヌクレオチドの可能なすべての順列を再現している。オリ

ゴヌクレオチドは、7 nmの間隔が保たれ、装填密度 3.4×10^{-12} モル/cm²、または100ミクロンのエレメント当たり 2.6×10^{-16} モルのオリゴヌクレオチドが提供される。標的核酸は、オリゴヌクレオチドアレープレートを厳密に調べるために用いられる。プローブは1000 Ci/nM-P32で標識される。標識されたプローブは、3M-Me4NCI中の10 nMのプローブ溶液中、42℃でハイブリダイゼーションするために、オリゴヌクレオチドアレープレートに接触させる。10%のハイブリダイゼーションおよび洗浄効率で、プローブと正確に対になる各々のオリゴヌクレオチドエレメントドットは、26アトモル (10^{-18}) のプローブと結合する。放射能標識の結合は、Bio-Image AnalyzerTM (Fuji, Waltham, MA) を用いて検出される。結合のパターンが評価され、プローブ核酸のヌクレオチド配列は、図1に示すように、既知配列のオリゴヌクレオチドエレメントに従って、ヌクレオチド配列を順に並べることによって決定される。

図1は、アレープレートに結合した三量体のオリゴヌクレオチドのマトリックスを基にした配列決定のための配置を示している。図1(a)は4つのヌクレオチドからなる基本マトリックスであり、図1(b)は完全な三量体マトリックスであり、43の三量体の順列の各々を示している。アレー中の下線で示したエレメントは、標的核酸が結合するサイトを示している。図1(c)は、標的核酸に相補的な配列が標的核酸を結合するサイトを持つ既知の配列からどの様にして構築されるかを示している。

(20)

特表平9-500568

配列表

(2) 配列番号: 1

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 10塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(c) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直線状

(i i) 配列の種類: DNA

(i i i) ハイボセティカル: YES

(i v) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: 中間部フラグメント

(x i) 配列: 配列番号: 1

ATTCTTGTTA

(21)

特表平9-500568

【図1】

FIG.1a { A C
G T マトリックス

AAA	AAC	ACA	ACC	CAA	CAC	CCA	CCC	} FIG.1b
AAG	AAT	ACG	ACT	CAG	CAT	CCG	CCT	
AGA	AGC	ATA	ATC	CGA	CGC	CTA	CTC	
AGG	AGT	ATG	<u>ATT</u>	CGG	CGT	CTG	<u>CTT</u>	
GAA	GAC	GCA	GCC	TAA	TAC	TCA	TCC	
GAG	GAT	GCG	GCT	TAG	TAT	TCG	<u>TCT</u>	
GGA	GGC	GTA	GTC	TGA	TGC	<u>TTA</u>	<u>TTC</u>	
GGG	GGT	GTG	<u>GTT</u>	TGG	<u>TGT</u>	<u>TTG</u>	TTT	

DNA フラグメント
-----ATTCTTGTTA----

ATT	} FIG.1c
TTC	
TCT	
CTT	
TTG	
TGT	
GTT	
TTA	

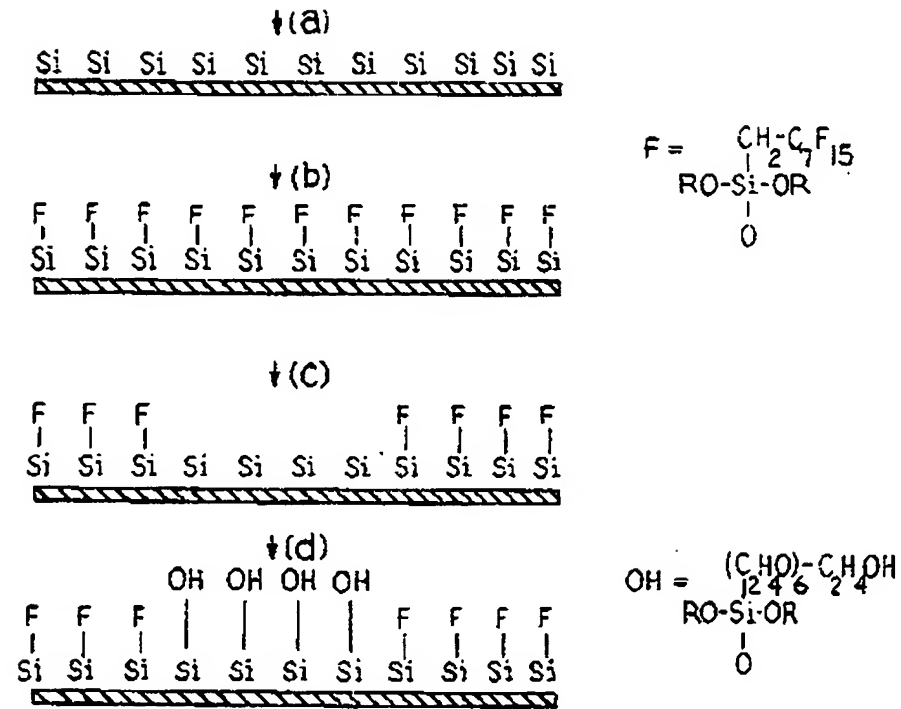
正しい組み立て 可能な N+1 リスト

(22)

特表平9-500568

【図2】

FIG. 2A

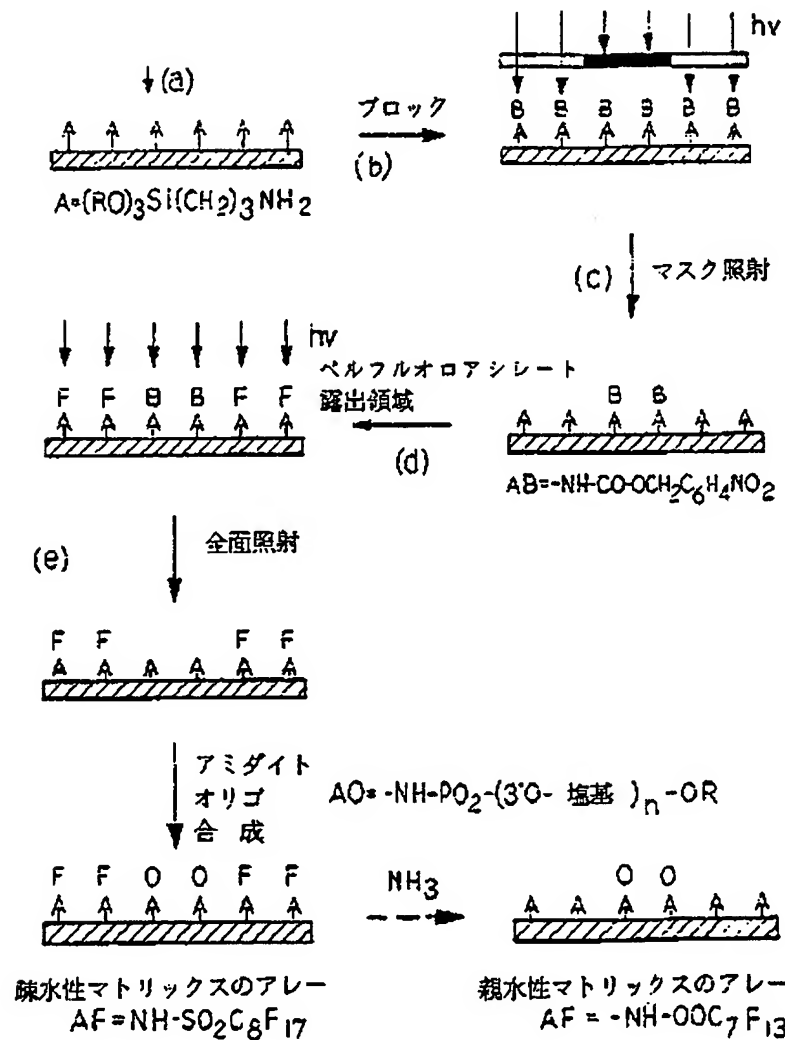


(23)

特表平9-500568

【図2】

FIG.2B
O-ニトロペンジルカルバメート
アレーのマスキング法

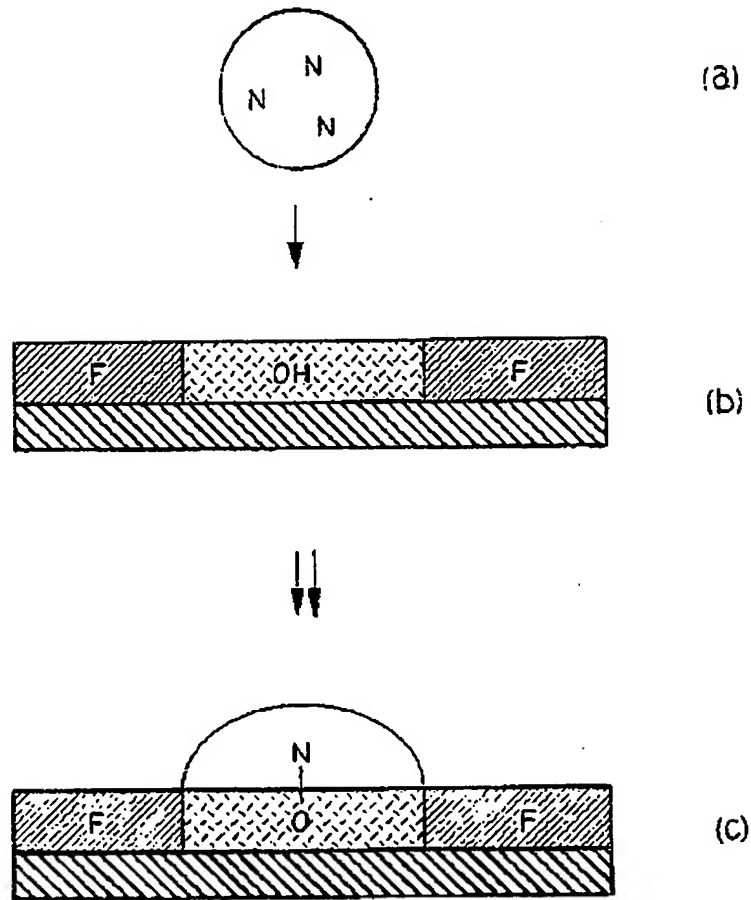


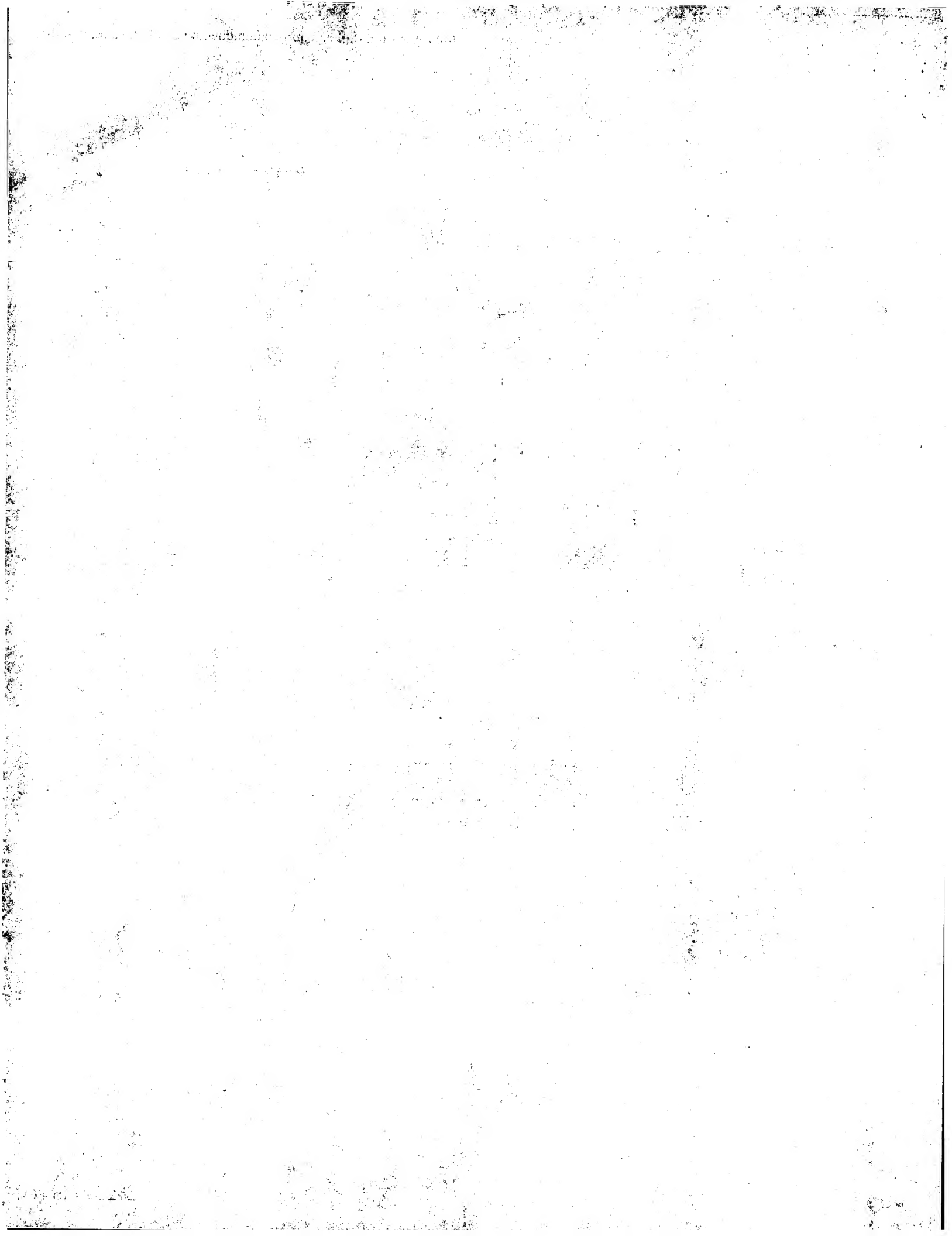
(24)

特表平9-500568

【図3】

FIG. 3



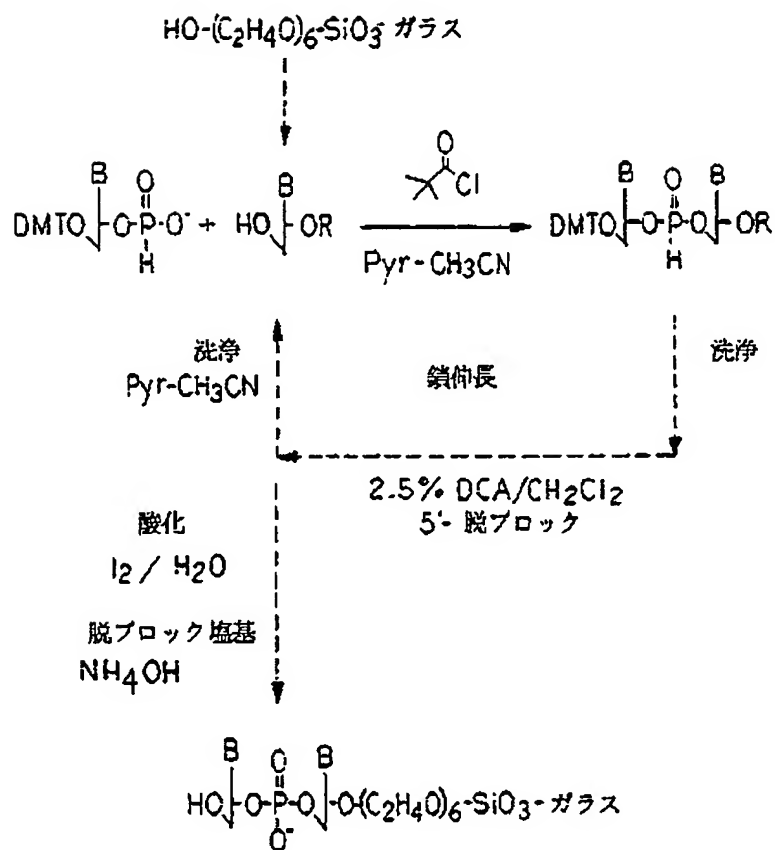


(25)

特表平9-500568

【図4】

FIG. 4



(26)

特表平9-500568

【図5】

FIG. 5a

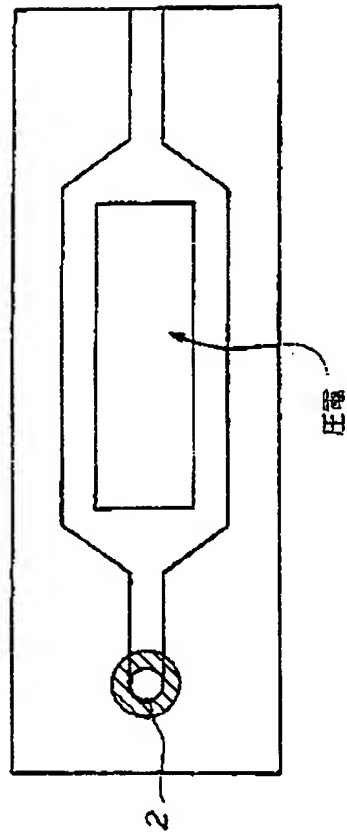
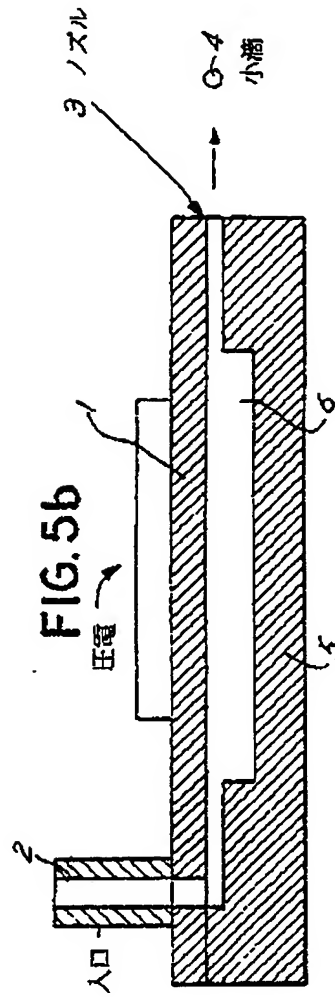


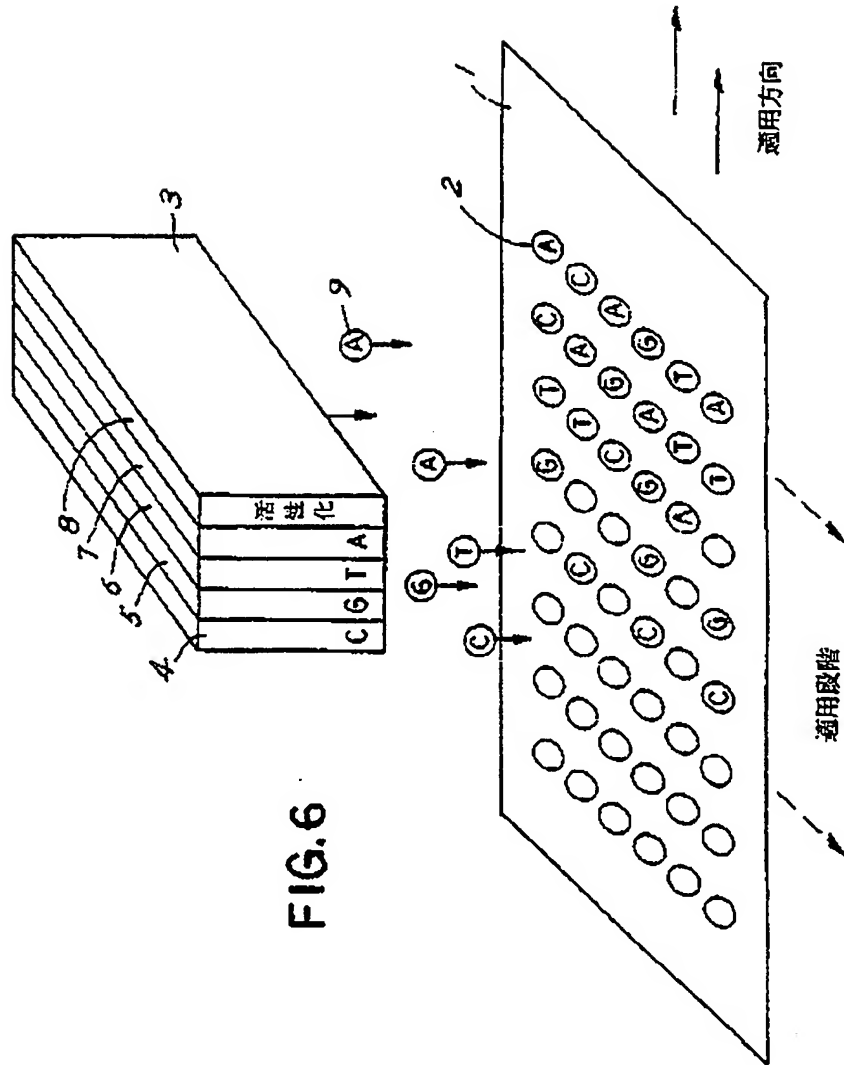
FIG. 5b



(27)

特表平9-500568

【図6】

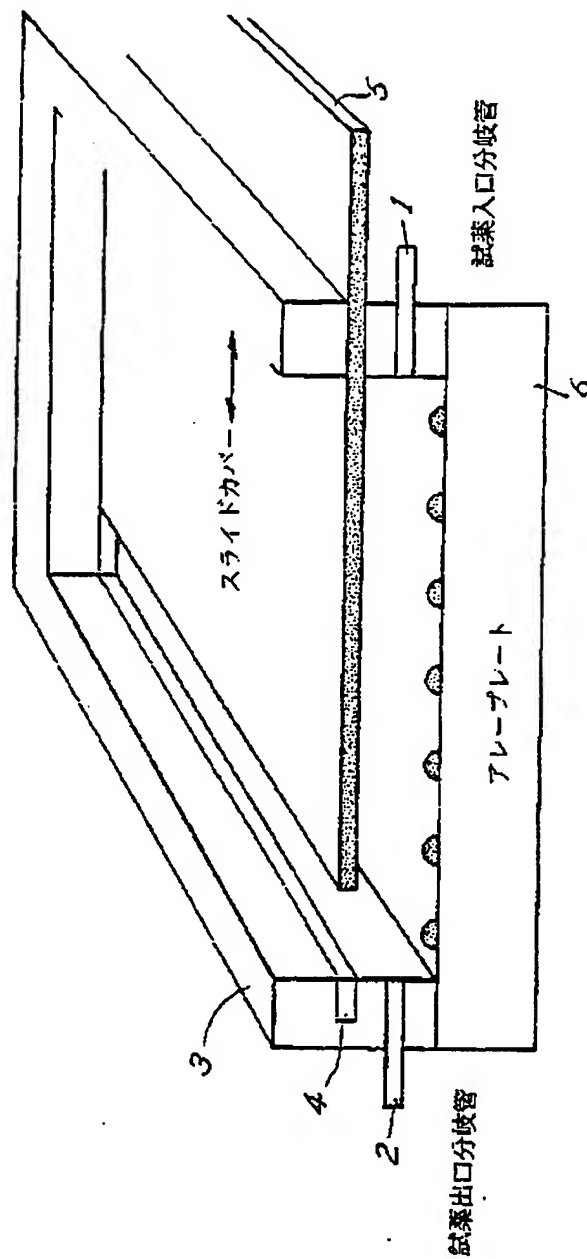


特表平9-500568

(28)

【図7】

FIG. 7



(29)

特表平9-500568

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

IPC 5 B01J19/00 C07H21/00 C03C17/30 C07B61/00 C07K1/04		Int. Appl. No. PCT/US 94/05896
According to International Patent Classification (IPC) and to date submitted classification and file		
B. FIELD OF SEARCH		
Inventive document(s) searched (classification system with which the document is applied) IPC 5 B01J C03C C07B C07H C07K		
Documents are listed after their publication date in the event that such documents are included in the field searched		
Inventive data are included during the international search phase of data base and, where practical, search report used		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with abstract, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim
A	EP, A, 0 161 058 (DOW CORNING CORPORATION) 13 November 1985 see the whole document ---	1
A	WO, A, 90 15070 (AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V.) 13 December 1990 see the whole document ---	1
A	WO, A, 90 03382 (ISIS INNOVATION LIMITED) 5 April 1990 cited in the application see the whole document ---	1
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of this IC. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed as annex.		
* Special categories of cited documents: "A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier documents not published on or after the international filing date "C" documents which may throw doubt on priority claimed in which is cited to establish the publication date of another (patent or other special means (as specified) "D" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to advance an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered an inventive step when the document is considered with one or more other such documents with consideration being given to a prior art "A" documents (member of the same patent family)		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 August 1994		05.09.94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2918, München 2 D-85011 München Tel: 49 89 318 24-2024, Fax: 49 89 318 24-2024 Telex: 411700 240-2024		Authorized officer Rinkel, L

Form PCT/ISA 210 (revised June 1992)

(30)

特表平9-500568

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Appl. No. PCT/US 94/05896
1. (Classification) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
A	SCIENCE, vol. 251, 1991 pages 767 - 773 FODOR, S.P.A. ET AL. 'LIGHT-DIRECTED, SPATIALLY ADDRESSABLE PARALLEL CHEMICAL SYNTHESIS' cited in the application see the whole document -----	1

Form PCT ISA 210 (01-01) of the search (July 1992)

